

PCT/JP 99/02711

24.05.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

EAKU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 8 年 5 月 2 6 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 0 年 特 許 願 第 1 6 3 0 2 3 号

09/701001

出 願 人

Applicant (s):

旭化成工業株式会社

REC'D 09 JUL 1999

WIPO PCT

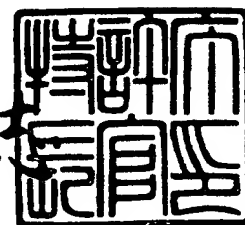
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1 9 9 9 年 6 月 1 7 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

伴 佐 山 建 志



出 証 番 号 出 証 特 平 1 1 - 3 0 4 1 1 7 (

【書類名】 特許願

【整理番号】 X10-573

【提出日】 平成10年 5月26日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C07K 16/28

【発明の名称】 C D 4 陽性細胞の分離装置および分離方法

【請求項の数】 6

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島 2 番地の 1 旭化成工業株式会社内

    【氏名】 大野 満春

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島 2 番地の 1 旭化成工業株式会社内

    【氏名】 草加 孝之

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都世田谷区松原 5-25-16

    【氏名】 森本 幾夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000000033

    【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100090941

    【氏名又は名称】 藤野 清也

    【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 014834

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 CD4 陽性細胞の分離装置および分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 CD4 分子に結合するキメラ抗体、1 本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いた CD4 陽性細胞分離装置。

【請求項 2】 H鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：1、2 および 3 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：4、5 および 6 に記載のアミノ酸配列であり、Fc 領域がヒト型であるキメラ抗体を用いた CD4 陽性細胞分離装置。

【請求項 3】 H鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：1、2 および 3 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：4、5 および 6 に記載のアミノ酸配列である 1 本鎖抗体を用いた CD4 陽性細胞分離装置。

【請求項 4】 キメラ抗体、1 本鎖抗体、またはそれらを組み合わせた抗体を用いたヒト CD4 陽性細胞の分離または検出方法。

【請求項 5】 H鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：1、2 および 3 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：4、5 および 6 に記載のアミノ酸配列であり、Fc 領域がヒト型であるキメラ抗体を用いたヒト CD4 陽性細胞の分離または検出方法。

【請求項 6】 H鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：1、2 および 3 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：4、5 および 6 に記載のアミノ酸配列を含有する 1 本鎖抗体を用いたヒト CD4 陽性細胞の分離または検出方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトCD4抗原に対する組換え抗体を利用したヒトCD陽性細胞の分離方法または該細胞の検出方法、および分離装置に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

ヒトCD4は分子量55kDの糖タンパク質で、モノマーとして細胞膜上に存在し、主としてT細胞に発現されている。CD4を発現しているT細胞（末梢T細胞の約65%）はヘルパーT細胞としての性質をもち、クラスII MHC分子によって提示された抗原を認識する。また、CD4はHIV (human immunodeficiency virus : エイズウイルス) と結合し、感染の際に受容体として働くことも知られている。免疫系においてヘルパーT細胞は抗原に対して適切に応答するのに不可欠であり、B細胞のほとんどの抗体応答に必須のものである。ヘルパーT細胞は主として抗原提示細胞の表面に結合した非自己抗原を認識した場合活性化され、インターロイキン2を分泌してT細胞の増殖を刺激してこれがB細胞の活性化を補助しており、さらには抗体の産生を促している。またリンパ球を補助するだけでなくγインターフェロンを分泌することによりマクロファージを活性化するヘルパーT細胞も存在する。

#### 【0003】

健常人では自己障害を防ぐために、自己反応性抗原受容体を持ったリンパ球クローンの除去 (clonal deletion)、それらの無反応性化 (clonal anergy)、その働きの抑制 (suppression) といった様々な機構を用意している (免疫寛容)。自己免疫疾患の発生に関するメカニズムはまだ十分には解明されていないが、このような免疫寛容機構の異常が自己免疫疾患の原因となると考えられている。自己反応性抗原受容体を持ったリンパ球クローンはCD4を発現しているヘルパーT細胞だけではないが、ヘルパーT細胞の自己免疫疾患における重要性は認識されている。

#### 【0004】

ある自己免疫疾患の治療方法としては、その症状の程度に応じて副腎皮質ホルモン剤の投与、脾臓の摘出、免疫抑制剤の投与などが適用される。しかしこうした薬物療法や摘脾手術を行なっても、効果的に回復しない症例も多く存在してい

る。こうした患者に対する治療方法についても絶対的なものは確立されていないのが現状であり対策が急がれている。

【0005】

自己免疫疾患の他の治療方法として、免疫吸着カラムを用いた血液の体外循環による自己抗体の吸着除去も種々試みられている。たとえば免疫グロブリンと結合性を有するプロテインAを担体に固定化したカラムの適用も検討されている。しかしプロテインAは高価であり、吸着特異性の点でもあまり優れず、さらには副作用の生じた症例も報告されており、こうした医療用機材に利用するには種々の問題点が残されている。

【0006】

近年においては、液性因子の血液からの除去のみならず、血液細胞分離技術が報告されている。しかし、用いるリガンドによっては抗原との結合性が弱い、抗原との反応特異性が低いなどの問題により、十分な細胞除去を期待できない、あるいは目的以外の細胞が非特異的に吸着されるといった問題がある。

【0007】

特開平3-32680号公報にTリンパ球に親和性を有するペプチドまたは脂質を固定化した分離材が、また、特開平6-154316号公報、特開平6-154317号公報、特開平6-218051号公報、特開平6-269663号公報にはCD4陽性細胞に親和性を有するペプチドを不織布に固定化したCD4陽性細胞捕集材がそれぞれ開示されているが、いずれもリガンドに用いているペプチドの抗原に対する親和性、特異性に問題があり、十分な細胞吸着能力を期待できない。特に後者は抗CD4抗体の抗原結合部位の形成に密接に関係している、相補性決定領域「CDR」とその間に介在する枠組領域「フレームワーク」の一部分のペプチドを用いており、一部分だけでは効果的な抗原結合は望めない。CDRには、H鎖とL鎖のそれぞれについて、N末端側から「CDR-1」「CDR-2」「CD-3」と呼ばれる3つの領域が存在することが知られており、少なくともH鎖あるいはL鎖の「CDR-1」「CDR-2」「CDR-3」の立体配置が抗体と実質的に同様に保たれていることが効果的な抗原結合を望む上で必須である。

本発明でいう「実質的に同じ機能」とは、抗原分子上のエピトープ、抗原との

結合力が実質上同じであることをいう。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

抗体は、一般に抗原との結合性が強く、かつ特異性が高いことが知られ、医療への利用が期待されている。しかし、医療機器作成に際し、抗体の製造に掛かる費用が問題となっている。抗体を効率よく生産し、医療機器への応用を行うことが必要である。そのため、抗体を効率よく生産する方法として、組換え抗体を作成する技術を確立し、それを医療機器へ応用することが期待される。

【0009】

【課題を解決するための手段】

モノクローナル抗体の作製は、通常目的の抗原を免疫した動物よりBリンパ球を分離し、ミエローマ細胞と融合することによりハイブリドーマを作製することに始まる。次に目的の抗原を用いたスクリーニングを行い、抗体産生ハイブリドーマを取得する。この際に抗原との結合性が強く、かつ特異性が高い抗体を産生するハイブリドーマを取得するためには数多くの細胞をスクリーニングしなければならず多大な労力を要する。本発明者らが鋭意検討した結果、H鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：1、2および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：4、5および6に記載のアミノ酸配列である4H5抗体がヒトCD4抗原に対して特に高い親和性と特異性をもつ抗体であることを見出した。

【0010】

1例を例示すれば、抗ヒトCD4抗体として知られるOKT4A抗体のヒトCD4抗原に対する結合親和性は、 $K_A = 4 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ と報告されており(Virginia L. Pulitoら、The Journal of Immunology, 156 : 2840-2850 (1996))、故に解離定数(KD：この値が低いほど結合親和性は高い)は、 $K_D = 2.5 \times 10^{-9} \text{M}$  ( $1/K_A = K_D$ より)。一方、本明細書中の実施例に記載の通り、4H5抗体のヒトCD4抗原に対する解離定数は、 $K_D = 8.08 \times 10^{-10} \text{M}$  (実施例5)である。これはOKT4A抗体より4H5抗体の方がヒトCD4抗原に対してより強く結合しうることを示している。

4H5抗体を産生するハイブリドーマ、Mouse-Mouse hybridoma 4H5は、日本国

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号：FERM P-16807として寄託されている。

#### 【0011】

生体内に存在する通常の抗体は、抗原特異的な可変領域塩基配列及び定常領域遺伝子の2つが必要である。定常領域遺伝子には少数のクラスが知られるが、H鎖L鎖の可変領域塩基配列は極めて多様性が高く、目的とする可変領域塩基配列の取得は非常に労力を要する。しかしながら、遺伝子増幅（PCR）や抗原を用いた酵素免疫測定法（EIA）による結合実験を駆使することにより、ハイブリドーマ中の複数の抗体遺伝子の中から目的であるヒトCD4抗原に対する抗体遺伝子を取得するに至り、その遺伝子を組換えてヒトマウスキメラ抗体、1本鎖抗体を大量に生産することを可能にした。

#### 【0012】

通常の抗体は大小2種類のポリペプチドからなり、その大きい方のサブユニットを「H鎖」といい、小さい方のサブユニットを「L鎖」という。また、それぞれのペプチドはN末端側に存在して抗原結合部位を形成する「可変領域」（または「V領域」）と、抗体のクラス別に一定の「定常領域」（または「Fc」）からなっている。可変領域は、更に、特に抗原結合部位の形成に密接に関係している相補性決定領域「CDR」とその間に介在する枠組領域「フレームワーク」に分けられる。CDRには、H鎖とL鎖のそれぞれについて、N末端側から「CDR-1」「CDR-2」「CDR-3」と呼ばれる3つの領域が存在することが知られている。図1にIgGの構造模式図を示す。

#### 【0013】

抗体の可変領域を構成するアミノ酸数は、抗体により異なることが多い。4H5抗体のH鎖の可変部位のアミノ酸配列は、配列表配列番号：35に示した。配列表配列番号：35のアミノ酸1位から30位はフレームワーク1、31位から35位はCDR-1、36位から49位はフレームワーク2、50位から66位はCDR-2、67位から98位はフレームワーク3、99位から107位はCDR-3、108位から118位はフレームワーク4を示す。4H5抗体のL鎖の可変部位のアミノ酸配列は、配列表配列番号：36に示した。配列表配列番号：36のアミノ酸1位から23位はフレームワーク1、24位



から38位はCDR-1、39位から53位はフレームワーク2、54位から60位はCDR-2、61位から92位はフレームワーク3、93位から101位はCDR-3、102位から111位はフレームワーク4を示す。これらのフレームワークとCDRの境は、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, 1991 (USA NIH 発行) に掲載されたマウス抗体可変領域の遺伝子配列を参考にして決定した。

【0014】

配列表配列番号：7には、配列表配列番号：35のアミノ酸9位から118位に相当する核酸塩基配列を示した。配列表配列番号：8には、配列表配列番号：36のアミノ酸9位から111位に相当する核酸塩基配列を示した。

【0015】

本発明は、次の細胞分離装置及びこれを使用する細胞の分離方法、あるいは検出方法に関する

- (1) CD4分子に結合するキメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いたCD4陽性細胞分離装置。
- (2) H鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：1、2および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：4、5および6に記載のアミノ酸配列であり、Fc領域がヒト型であるキメラ抗体を用いたCD4陽性細胞分離装置。
- (3) H鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：1、2および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：4、5および6に記載のアミノ酸配列である1本鎖抗体を用いたCD4陽性細胞分離装置。
- (4) キメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組み合わせた抗体を用いたヒトCD4陽性細胞の分離または検出方法。
- (5) H鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：1、2および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：4、5および6に記載のアミノ酸配列であり、Fc領域がヒト型であるキメラ抗体を用いたヒトCD4陽性細胞の分離または検出方法。

(6) H鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：1、2および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2およびCDR-3 がそれぞれ配列表配列番号：4、5および6に記載のアミノ酸配列を含有する1本鎖抗体を用いたヒトCD4陽性細胞の分離または検出方法。

## 【0016】

本発明でいう「抗体」とは、通常生体内に存在する形の抗体の他に、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも1つ含む分子を含む。例えば、H鎖の可変領域のみ含むペプチド、1組のH鎖断片とL鎖断片からなるFab、2組のH鎖断片とL鎖断片からなる(Fab')<sub>2</sub>、H鎖断片とL鎖断片が同一ペプチド上に直列に結合した1本鎖抗体「ScFv」なども含まれる。

## 【0017】

本発明でいう「ヒトCD4抗原」とは、Parnes, J.R.によりに報告(Adv. Immunology誌、44巻、265頁、1989年)され、リンパ球上に発現するヘルパーT細胞の抗原マーカーとして知られている。またCD4抗原はヒトでは他に単球、マクロファージなどにも発現されている。

## 【0018】

抗体の抗原特異性と抗原への結合の強さが、主にCDRのアミノ酸配列によって決定されることはマウス抗体のヒト化で示されている(Gussow, D. and Seemann, G., Methods in Enzymology, 203:99-121 (1991); Glaser, S.M. et al., J. Immunology 149:2607-2614 (1992))。

## 【0019】

COS7細胞による抗体の分泌発現には、種々のベクターが使用可能であるが(Whittle, N. and Adair, J. et al. (1987), Protein Eng., 1 (6), 499-505.; Sutter, K.D. and Feys, V. et al. (1992), Gene 113, 223-30.)、ヒト抗体の発現プラスミド(pG1)を利用し、ヒト・マウスキメラ抗ヒトCD4抗体を発現し得るプラスミドpG14H5を作成した。これをCOS7細胞へ遺伝子導入し、ヒト抗CD4抗体の生産を行える。ここで言う、ヒト・マウスキメラ抗体とは、可変領域がハイブリドーマ由来のマウス遺伝子配列であり、定常領域がヒト由来の遺伝子配列

から構成される遺伝子によって生産された抗体を示す。pG1 は、国際公開公報W0 95/15393に記載のpSE プラスミドのヒト C $\gamma$ 1 の配列に付加された膜通過ドメイン (TM) を除去して、通常の抗体の様に生体内に分泌される様改良したプラスミドである。その作成の詳細は、参考例1として記してある。つまり、ヒト定常領域をコードする遺伝子配列を有しており、マウス可変領域遺伝子をつなぐことにより、ヒトマウスキメラ抗体を発現しうるプラスミドである。

## 【0020】

COS7細胞は通常10%ウシ胎児血清 (FBS)加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 培地) を用い、5% CO<sub>2</sub>存在下37℃で培養する。COS7細胞への遺伝子導入法や、遺伝子導入後の細胞の育種生産法は、バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法；横田 崇、新井 賢一 羊土社(1994)等の実験書に記載されている。COS7細胞への遺伝子導入法は、電気穿孔法その他、DEAEデキストラン法 (Bebbington, C.R. (1991) ; METHODS : A Companion to Methods in Enzymology, 2 (2), 136-45.) であっても良い。

## 【0021】

本発明では、pG1に組み込まれた定常領域遺伝子が C $\gamma$ 1 であるため、各クローンはIgG1として発現した。抗体の生産時には、血清由来のウシ抗体の混入を避けるために、無血清のDMEM培地によって培養することが望ましい。こうして培養上清中に分泌された抗CD4抗体は、例えばプロテインAやプロテインGを用いる一般的な IgG抗体の精製法によって容易に精製することができる。

## 【0022】

工業生産の場合の宿主としてはCHO 細胞、ミエローマSp 2/0細胞がよく知られている (Xiang, J. et al. (1990) Mol. Immun., 27, 809 ; Bebbington, C.R. et al. (1992) Bio/technology, 10, 169 ; Larrick, J.W. and Wallace, E.F. et al. (1992) Immunol. Rev. 130, 69-85. ; Deyev, S.M. and Lieber, A. et al. (1994) Appl. Biochem. Biotechnol. 47 (2-3), 143-54.)。例えばCHO 細胞では、MTX 等の薬剤により生産性の高いクローンを選択する方法も報告されており (Bebbington, C.R. (1991) METHODS : A Companion to Methods in Enzymology, 2 (2), 136-45.)、安定な高生産株が取得できれば、その株を組換え抗ヒトC

D4 抗体の工業的生産に利用できる。

【0023】

ヒトマウスキメラ抗体は、医薬品として利用した場合、ヒト体内での抗原性がマウス抗体に較べ極度に低下しており、より安全性が向上している。通常の抗体をペプシンなどのプロテアーゼで分解した  $F(ab')_2$  化した場合でもヒトFcを利用した断片は、マウスのものに較べ安全性が高い。また、医療機器への応用に際しても、リガンドとして利用されている抗体がプロテアーゼ等の分解を受け微量に遊離してくる可能性があるが、そうした分解産物に関してもヒト化されたものは、安全性が高いといえる。

【0024】

1 本鎖抗体においては、低分子化することにより抗原性を低下させ得る効果が期待される。抗体をパブリンなどのプロテアーゼ処理し Fab 化した抗体は、マウスの定常領域を依然として含むが、1 本鎖抗体はそれらを除いたものであり、抗原性が非常に低くすることができ得る。ハイブリドーマから 1 本鎖抗体を単離する方法は、Recombinant Phage Antibody System キット（ファルマシア社）などを利用することが可能な場合もあるが、生産宿主となる大腸菌にとって該 1 本鎖抗体が毒性を持ち、大腸菌の死滅、該 1 本鎖抗体の分解を起こすような場合には、キットを有効に使用できず多くの工夫を要する。1 本鎖抗体は、pSE380 プラスミド（インビトロジェン社）や pET24d(+) プラスミド（ノバジェン社）などの誘導性のベクターと宿主となる菌種を検討することにより、調製し得る。また、生産においては、上述の方法の他、真核細胞発現系、昆虫細胞発現系、酵母細胞発現系も有効に利用しうる。H 鎖及び L 鎖を結合するリンカーは、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) × 3 回繰り返しの 15 残基のアミノ酸を使用したか、本配列に限定されずに利用することができる。

【0025】

本発明で生産した抗体を利用し、CD4 陽性細胞の分離を行うことができる。本発明により、体外において血液細胞懸濁液から、もしくは体外循環により血液から効率よく CD4 陽性細胞を分離することが可能となり、分離した細胞もしくは CD4 陽性細胞を除去した細胞群は、種々の疾患の治療に用いうる。CD4 陽

性細胞を除去した細胞混合液、血液製剤の作成、もしくはCD4陽性細胞を主たる成分とした細胞懸濁液；CD4陽性細胞製剤の作成を容易に行うことができる。CD4陽性細胞除去により自己免疫疾患である慢性関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデスなどの症状の改善が期待される。

## 【0026】

抗体の形状として、生産抗体分子をそのまま利用することも可能であるが、各種プロテアーゼ処理により得られる抗原結合部位を含む断片である Fab、F(ab')<sub>2</sub>、FvあるいはFdなども適用することができる。これらの断片については、「抗体工学入門」（地人書館）などに説明がされている。その他にも本発明をヒト体内の血液の体外循環に応用する場合には抗体が血液中に遊離した際の副作用、抗原性などを考慮して可変領域以外の部分をヒト型抗体にするようなキメラ抗体を用いることも有用である。これら抗体の作製方法は特に限定されるものではないが、高純度に精製されたものを用いなければならない。モノクローナル抗体の生産方法は、通常行なわれているハイブリドーマをマウスの腹腔で増殖させ腹水から生産された抗体を回収する方法、もしくは、無血清培地による培養上清から得る方法でよい。断片ペプチドの場合には抗体分子の酵素処理により得ることができるが、遺伝子工学的な手法により細菌、酵母などに産生させることも可能である。これらの方法により得たモノクローナル抗体、モノクローナル抗体由来抗体断片、ペプチド等を組み合わせることにより、より強固な結合性を生じる。

## 【0027】

現在、細胞の分離方法として、抗体を利用して特異的に目的の細胞だけを分離する方法が開発されつつある。例えば、蛍光抗体標識細胞分離法、水不溶性担体に目的細胞と親和性を有するリガンドを固定化しこれに目的細胞を直接的または間接的に結合させる方法、免疫吸着カラムによる分離および免疫磁気ビーズによる分離法などがある。

## 【0028】

蛍光抗体標識細胞分離法は、最初に細胞混合液を目的とする細胞に発現されている膜抗原を認識する蛍光標識したモノクローナル抗体とインキュベートした後、処理した細胞にセルソーターなどでレーザー光を照射することにより抗体が結

合した細胞のみが蛍光を発することを応用して、蛍光抗体が結合した細胞を分離する方法である。

## 【0029】

目的細胞の膜表面に存在する抗原に対するモノクローナル抗体を直接分離装置表面に固定化して用いる方法、および最初に細胞混合液を目的細胞上の膜抗原に結合するモノクローナル抗体とインキュベートして、それから細胞表面上の抗体に結合する抗イムノグロブリン抗体のようなりガンドを固定化した細胞分離装置で処理される方法が国際公開公報W087-04628に記載されている。細胞分離は担体または装置に固定化されたモノクローナル抗体に対して、該抗原陽性細胞が直接もしくは、間接的に結合することで行なわれる細胞分離方法である。これらの方法は、抗体を固定化したプラスチックシャーレ上で分離されるもので、細胞混合液は最初抗体を固定化したプラスチックシャーレ上に注がれ、抗体と目的細胞上の膜抗原とを結合させるためにインキュベートされる。インキュベート後プラスチックシャーレを洗浄して結合していない細胞を除去して分離する。免疫吸着カラム法は目的細胞上の膜抗原に対する抗体などのリガンドをビーズ表面に固定化しこれをカラムに充填して細胞分離を行なうものである。

## 【0030】

目的細胞上の膜抗原に対する抗体をビオチン標識したものを細胞混合液中に加えて、インキュベートすることにより細胞-抗体-ビオチン結合を形成させた後、多孔質アクリルアミドゲルにアビジンを固定化したビーズを充填したカラムを通過させビオチン-アビジンの強力な結合を利用して目的細胞をカラム内に結合させて分離する方法が国際公開公報W091-16116に記載されている。

免疫磁気ビーズ法は最初に細胞混合液を抗体の結合した磁気ビーズとインキュベートすることにより目的細胞を磁気ビーズで標識する。標識後磁気装置を用いて標識されていない細胞から標識細胞を分離する。

しかし、これらの方法により細胞分離を実行するためには多量の抗体分子を必要とし、特に医療現場への応用に際してはそのコストが問題となる。本発明により生産される組換え抗体によりそのコストを容易に下げることができる。

## 【0031】

同じ細胞を認識する2種類または、2種類以上の抗体を直接固定化する担体の一つとして、水不溶性の担体を利用できる。CD4分子と、その他のCD4陽性細胞に発現する分子、例えばGタンパク共役型レセプターで、HIV感染のセカンドレセプターとして働く、Fusin (CXCR-4) (Feng, Y ら、Science、272 (5263) 巻、872-877, 1996年) や、同じく HIV感染のセカンドレセプターとして働く、CCR-5 (Deng, H ら、Nature、381 (6584) 巻、661-666, 1996年) 等と組合せも可能である。これらの分子は発現頻度が少なく、分離効率が悪いが、CD4分子を認識する抗体と同時にこれらの分子を認識する抗体を組み合わせることにより、これらの発現細胞を単離しうる。

## 【0032】

また、目的のCD4陽性細胞にCD4抗体を反応させておき、結合した抗CD4抗体に対する抗体を利用して、水不溶性担体に間接的に反応させることもできる。例えば、あらかじめ細胞に固定化させる抗体にビオチンや、磁気ビーズを結合させておき、次にそのビオチンや磁気ビーズと結合しやすい物質、例えばアビジンや磁気を結合または含む水不溶性担体と反応させることにより、容易に細胞が結合した水不溶性担体を回収することができる。また抗体の結合した細胞と、抗イムノグロブリン抗体を結合した水不溶性担体と反応させ、水不溶性担体を洗浄または回収することで選択的に目的の細胞だけを分離することができる。水不溶性担体である磁気ビーズに固定化した抗体を利用すれば、磁石等により分離を効率化することもできる。

## 【0033】

本発明に用いられる容器形状として、水不溶性担体を充填したカラム、フラスコ状あるいは、フラスコ状ケースに水不溶性担体を充填したものが例示される。これらの容器形状とこれらの抗体を直接または、間接的に固定化した不溶性担体との組み合わせによりCD4陽性細胞の分離器を作製しうる。また、これらの分離器は、細胞懸濁液や、生理食塩水などを流すポンプと組み合わせることにより、細胞分離システムとして利用性の高いものにすることができる。

## 【0034】

抗体を水不溶性担体に固定化する際に、抗体と水不溶性担体との間にスペーサ

ーを介して結合することも有用である。更に、必要に応じて水不溶性担体と化合物を任意の長さの分子（スパーサー）を介して結合させてもよい。スパーサーの詳細に関しては、例えば、「アフィニティクロマトグラフィー」（笠井猷一ら、東京化学同人出版、1991年、105～108頁）を参照することができる。スパーサーの例として、ポリメチレン鎖及びポリエチレングリコール鎖等が挙げられる。スパーサーの長さは500Å以下であることが好ましく、200Å以下であることが更に好ましい。スパーサーを介して水不溶性担体に化合物を結合させる方法としては、例えば、水不溶性担体としてアガロースを用いる場合、アガロースの水酸基とスパーサーとして用いるヘキサメチレンジイソシアナートの片側のイソシアナート基を反応、結合させ、残ったイソシアナート基と抗体のアミノ基、水酸基又はカルボキシル基等を反応、結合させる方法等が挙げられる。

## 【0035】

本発明でいう水不溶性担体とは、常温の水溶液中で固形状態にあるものをいい、いずれの形状であってもよい。形状を例示すると球状、立方状、平面状、チップ状、繊維状、平膜状、スポンジ状、中空糸状のものが挙げられる。これらの内、細密充填のしやすさ、抗体を比較的均質に表面に保持しやすい点、実有効面積を比較的多く確保できる点、及び細胞懸濁液の流通面から、球状、粒状及び繊維状のものが望ましい。

## 【0036】

水不溶担体の材質は、表面に抗体を保持できるものであれば、無機化合物、有機化合物を問わないが、細胞懸濁液との接触時に溶出物が少ないこと、形状の制御がより容易なことから有機高分子化合物が望ましい。このような例として、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメタクリレートエステル、ポリアクリレートエステル、ポリアクリル酸、ポリビニルアルコール等のビニル系化合物あるいはその誘導体の重合体及び共重合体、ナイロン6あるいは66等のポリアミド系化合物、ポリエチレンテレフタレート等のポリエステル系化合物、セルロース等の植物由来の多糖類系化合物等が挙げられる。また、これらと磁石を組み合わせ、これらの水不溶性担体の回収を容易にすることもできる。

## 【0037】



水不溶性担体を修飾し、表面に親水性を付与することも本発明に好適に用いられる。アルブミン、グロブリン等の生体由来タンパク質を固定化することや、合成官能基を導入することによって、水不溶性担体表面に親水性を付与しうる。親水性を付与する合成官能基の例を示すと、繰り返し単位が2から1500のポリエチレングリコール鎖、水酸基、アミド基、エーテル基、エステル基がそれに該当する。但し、ポリエチレングリコール鎖と水酸基は結合していても、別に存在しても良い。親水性を付与するポリエチレングリコール鎖を有するモノマーの例を挙げると、メトキシジエチレングリコールメタクリレート、メトキシトリエチレングリコールメタクリレート等の末端メトキシメタクリレート、メトキシジエチレングリコールアクリレート、メトキシトリエチレングリコールアクリレート等の末端メトシアクリレート、及びメチル基の代わりに水素が結合した末端水酸基を有するメタクリレート及びアクリレート、また末端に1つ以上の重合性の官能基を有する繰り返し単位が2～1500のポリエチレングリコール鎖を有するモノマー全般をさす。更に、担体に直接結合させる場合、繰り返し単位2～1500のポリエチレングリコール誘導体も含まれる。親水性を与えるその他の置換基を有するモノマーの例を示すと、ビニルピロリドン等が挙げられるがこれに限定されるものではない。更に重合性官能基は1つ以上幾つ存在しても良い。重合性の官能基とは、単独または2つ以上の官能基によって重合できる官能基を指し、例を挙げるとビニル基、アセチレン基、ジエン基等の炭素多重結合、エポキシ基、オキセタン基等の環構造、等が挙げられるがこれに限定されるものではない。

#### 【0038】

更に、上記官能基と共に非イオン性官能基が存在しても良くその例を挙げると、非イオン性官能基で特に親水性の向上を目的にしたジメチルアミド基、ジエチルアミド基、ジイソプロピルアミド基等のアミド基、ポリエチレンテレフタレート鎖、ポリブチレンテレフタレート鎖等の芳香族ポリエステル鎖及び脂肪族ポリエステル鎖等のポリエステル鎖、メチレングリコール鎖、プロピレングリコール等のポリエーテル鎖、ポリカーボネート鎖、等の非イオン性親水性官能基、または、疎水性付与を目的としたアルキル鎖、弗化アルキル鎖、アリル鎖等の非イオン性官能基全般を含む。以上の何れの官能基が共存しても良いが、好ましくは、

非イオン性親水性官能基を有する場合が良好である。

【0039】

水不溶性担体を修飾し、表面に親水性を付与する方法として、共有結合、イオン結合、放射線やプラズマによるグラフト法、物理吸着、包埋あるいは基材表面への沈澱不溶化等あらゆる公知の方法を用いることもできる。従って、高分子化合物やその単量体を放射線或いはプラズマ等を用いてグラフト重合したり、共有結合するなどの公知の方法により表面改質（特開平1-249063号公報、特開平3-502094号公報）を施す方法は本発明に好適に用いられる。

【0040】

水不溶性担体表面に抗体を固定化する方法には、化学的あるいは放射線や電子線を用いてのグラフト法によって水不溶性担体表面に抗体を共有結合する方法、あるいは、化学的方法により水不溶性担体表面の官能基を介して共有結合する方法などがある。この中で官能基を介しての共有結合方法が使用時の抗体の溶出の危険性が無く好ましい。水不溶性担体が被覆層を有する場合は、その被覆層表面に不溶化することもできる。

【0041】

水不溶性担体、あるいはその被覆層表面に抗体固定化のための活性基を得る方法の一例としてハロゲン化シアン法、エピクロロヒドリン法、ビスエポキシド法、ブromoアセチルブロミド法、ハロゲン化アセトアミド法等がある。具体的には、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、チオール基、酸無水化物、サクシニルイミド基、置換性ハロゲン基、アルデヒド基、エポキシ基、トレシル基などが挙げられる。抗体固定化のしやすさとして、ブromシアン法、N-ヒドロサクシンイミド基法、ハロゲン化アセトアミド法が特に望ましい。

【0042】

活性基に用いるハロアセトアミノメチル化剤としては、N-ヒドロキシメチルクロロアセトアミド、N-ヒドロキシメチルフルオロアセトアミド、N-ヒドロキシメチルブromoアセトアミド、N-ヒドロキシメチルヨードアセトアミド等が良好に用いられる。中でも、経済性及び安定性の面から好ましくは、N-ヒドロキシメチルブromoアセトアミド、N-ヒドロキシメチルヨードアセトアミド、等が良好に用い

られる。水不溶性担体に導入されたフルオロ基、クロロ基は活性基導入後に、ヨウ化カリウム或いは臭化カリウムの溶液で処理することで容易にヨウ素基或いは臭素基に変換できる。これらの活性基を導入した水不溶性担体の製造に用いられる酸触媒としては、強酸特にプロトン酸であれば何れのものでもよいが、敢えて例を挙げるとトリフルオロメタン、メタン、ベンゼン、トルエン等のスルホン酸誘導体及び硫酸、塩化亜鉛、塩化アルミニウム、四塩化スズ等のフリーデル・クラフツ触媒等が良好に用いられる。

#### 【0043】

他の抗体由来の可変領域の遺伝子を組み合わせることにより、バイスペシフィック抗体、マルチスペシフィック抗体の生産も可能となる。マルチスペシフィックとは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を少なくとも2種類以上有する抗体を示す。中でもバイスペシフィックとは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を2種類以上有する抗体を示す。例えば、通常の抗体の一方の抗原結合部位がCD4抗原を認識し、もう一方の抗原結合部位をTリンパ球抗原CD3等に対するバイスペシフィック化したものは、CD4陽性Tリンパ球をより強く認識することが可能であると考えられる。CD3以外にも、汎リンパ球マーカー例えばCD2, CD5, CD6, CD7などが利用し得る。これらを組み合わせてIgMとして発現させれば、バイスペシフィック、マルチスペシフィックの抗体を作成し得る。こうした生産時にバイスペシフィック化する以外に、モノクローナル抗体を生産、精製し、その後に抗体同士を結合させ、バイスペシフィック化、マルチスペシフィック化することができる。

#### 【0044】

1本鎖抗体の場合において、生産時でのバイスペシフィック化、マルチスペシフィック化が可能であり、1ペプチド内に複数の抗原認識部位の組み合わせのH鎖L鎖を繰り返して並べることにより生産させることができる。生産、精製後に結合させることもできる。

#### 【0045】

これらは、異なる抗原に対してのみならず、同一分子内の異なるエピトープ、例えば異なる抗CD4抗体を組み合わせることも可能である。抗CD4抗体は、

いくつか報告されている。例えばLeu-3a抗体、Leu-3b抗体（ベクトンデッキンソン社）、OKT4抗体、OKT4A 抗体（オーソ社）、T4抗体（コールター社）、MT310抗体（ダコ社）、F101-69 抗体、16P25 抗体（バイオシス社）、Edu-2 抗体、MEM-115 抗体（シンバスバイオテクノロジー社）、7E14抗体（エクサルフィアコーポレーション社）、BL4 抗体、13B8.2抗体（イムノテック社）、KT69-7抗体（ラブリジョンコーポレーション社）、B-F51 抗体（プロゲンバイオテクニク社）、BL-TH4抗体（サンバイオBV社）、94B1抗体、L197抗体、L80 抗体、L93 抗体、L201抗体、L34 抗体、L202抗体、L200抗体、L252抗体、73F11 抗体、72G4抗体、NUTH1 抗体、L71 抗体、RFT4抗体、MT151 抗体、MT321 抗体（D.G. Healey ら、Eur. J. Immunol.誌、21巻、1491頁、1991年）、OKT4B 抗体、OKT4C 抗体、OKT4D 抗体、OKT4E 抗体、OKT4F 抗体、Q6D3抗体、L77 抗体、L104抗体、L83 抗体、L190抗体、L122抗体、L120抗体（Matthias Merkenschlager ら、The J.Immunol.誌、145巻、2839頁、1990年）などが知られ、これらの抗体遺伝子を単離し、生産に用いることができる。

#### 【0046】

1 本鎖抗体のアミノ酸配列は、配列表配列番号：9 および配列番号：10に示した。また、それをコードする核酸配列の例をアミノ酸配列と共に示した。配列番号：9のアミノ酸配列1位から22位は大腸菌から分泌用シグナルを含む配列、23位から133位はL鎖の可変領域、134位から148位はリンカー、149位から266位はH鎖の可変領域、267位から305位まではFLAG-tag(270位から277位)、c-myc-tag(281位から290位)、His×6-tag(296位から301位)を含む配列を示す。配列番号：10のアミノ酸配列1位から22位は大腸菌から分泌用シグナルを含む配列、23位から140位はH鎖の可変領域、141位から155位はリンカー、156位から266位はL鎖の可変領域、267位から305位まではFLAG-tag(270位から277位)、c-myc-tag(281位から290位)、His×6-tag(296位から301位)を含む配列を示す。

#### 【0047】

配列番号：9 および配列番号：10に記載のアミノ酸配列1位から20位を欠失させ、大腸菌菌体内に1本鎖抗体を発現することも可能である。また、配列番号：

9 および配列番号：10に記載のアミノ酸配列 267位から 305位までは、1本鎖抗体の検出および精製のための配列であり、欠失あるいは如何なる配列にも置換し得る。大腸菌からの分泌シグナル及び検出、精製のための配列を含むベクターの作製は参考例2として示した。配列番号：9のアミノ酸配列 134位から 148位および配列番号：10のアミノ酸配列 141位から 155位のリンカーは、L鎖およびH鎖の可変領域の立体構造を実質的に4H5抗体と同等に保持できるものであれば、如何なる配列にも置換し得る。配列番号：9および配列番号：10に記載のアミノ酸配列 305位の Lys残基は水不溶性の担体に固定化する場合に1本鎖抗体分子の方向性を揃えるなど、有効に働くが、より固定化効率を上げるために Lys残基を複数導入することもできる。また、Cys残基を導入することも有効である。上述のような改変は遺伝子工学的手法により容易に実施しうる。

【0048】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施例を説明するが、これら実施例は具体例により本発明を更に説明するものであって、本発明を限定するものではない。

#### 【参考例1】

pG1 プラスミドの調製を行った。膜結合型ヒト抗体の発現ベクターpSE(国際公開公報W095/15393)の膜貫通領域(TM)を除去し、ヒト抗体を分泌発現可能なベクターを作製した。まず発現ベクターpSEを制限酵素SalIで消化後、切断末端を平滑化した。この反応は、DNA Blunting Kit(宝酒造社)を用い、添付のプロトコールに従って操作した。以上の処理を行った発現ベクターpSEを制限酵素ApaIで消化後、0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、C $\gamma$ 1遺伝子及び膜貫通領域(TM)を含む遺伝子領域が欠失したpSEベクターDNAを抽出精製した。この反応はGeneClean II Kit(Bio 101社)を用い、添付のプロトコールに従って操作した。抽出したpSEベクターの制限酵素切断末端は、ウシアルカリフォスファターゼ(宝酒造社)により、自己環化が起きないように処理した。次に、ヒトC $\gamma$ 1遺伝子の全長が組み込まれたプラスミドDNA pUCCG1を制限酵素KpnI(宝酒造社)で消化し、切断末端を平滑末端化した後、制限酵素ApaIで消化した。この反応物を0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、C $\gamma$ 1遺伝子の全長を含むDNA断片を抽

出精製した。この DNA断片と、先の処理を行った pSEベクターをライゲーションキット Ver.2(宝酒造社)を用いて連結し、連結反応産物を大腸菌 DH5株へ導入した。出現したコロニーから数個を選んで培養し、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。pSEベクターに存在する適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られたプラスミドを pG1とした。図2に pG1プラスミドの図を示した。

【0049】

【参考例2】

1 本鎖抗体 (ScFv抗体) を産生するベクターは、抗CD4抗体遺伝子を導入する前にあらかじめ大腸菌からの分泌シグナル、及び精製、検出用のtagをコードする配列を含むプラスミドの作成を行った。大腸菌からの分泌シグナル (PelBタンパク質のシグナル配列) の取得は、配列表配列番号: 21 (5' TCATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCGGCCAG 3') 及び配列番号: 22 (5' TGCGGCCGCAGCCATGGTGTGTTGCGGCCATCGCCGGCTGGGCCGCGAGGAGCAGCA 3') の2種を等量混合し、94℃ 5分、熱変性後65℃にて5分アニールさせ、72℃ 10分、GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、ポリメラーゼにより伸長反応を行った。この断片を TA cloning kit (インビトロジェン社) を使用し、クローニングした。これにより大腸菌からの分泌シグナルをコードするcDNAを取得した。

【0050】

精製、検出用のtagをコードする配列の取得は、配列表配列番号: 23 (5' TGCGGCCGCAGACTACAAGGATGACGATGACAAAGGCTCGAGCGAGCAGAAGCTGA 3') 及び配列番号: 24 (5' GGTGGGTGCGACCTCGAGCCCAGATCCTCTTCGCTGATCAGCTTCTGCTCGCTCGAGC 3') の2種を等量混合し、94℃ 5分、熱変性後60℃にて5分アニールさせ、72℃ 10分、GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、ポリメラーゼにより伸長反応を行った。この反応後のサンプルをテンプレートとして、さらに以下に示すプライマーを用いてPCR反応を行い、増幅された断片を TA cloning kit (インビトロジェン社) を使用し、クローニングした。これによ

り精製、検出用のtag をコードするcDNAを取得した。使用したプライマーは配列表配列番号：25 (5' TCGGCGCCGAGACTACAAGGATG 3') 及び配列番号：26 (5' TAAGCTATCATTGGTCGA CCCGTGGTGATGATGATGGTGGGTCGACCTCGAGCC 3') を使用した。PCR 条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase(宝酒造社) を用い、94℃ 1分、62℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして、18サイクル行った。

PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社) を使用した。クローニングした遺伝子を、大腸菌からの分泌シグナルをコードするcDNAは、制限酵素BspHI (New England Biolabs社) 及びNotI (宝酒造社) で消化し、精製、検出用のtag をコードするcDNAは、制限酵素HindIII(宝酒造社) 及びNotI (宝酒造社) で消化した後、3.5%アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA 断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからの DNA断片の抽出には、PCRprep(プロメガ社) を用いて行った。

#### 【0051】

pET24d(+) プラスミド (ノバジェン社) は予め、マルチクローニングサイト中の制限酵素NotIサイトから制限酵素Bpu1102Iサイト間の除去を行った。制限酵素NotI (宝酒造社) 及び制限酵素Bpu1102I (宝酒造社) を用いてpET24d(+) プラスミドを消化し、Klenow fragment (New England Biolabs社) とdNTP mixture (宝酒造社) を用いて添付のプロトコールに従い平滑末端化した。このプラスミド DNA断片を1%アガロースゲルにて電気泳動し、切り出し抽出した。これを自己環化させることによって、制限酵素サイトの除去を行ったpET24d(+) プラスミドを取得した。自己環化は、ライゲーションVer. 2キット (宝酒造社) を使用した。またアガロースゲルからの DNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit (Bio 101社) を用いて行った。

#### 【0052】

pSE380プラスミド (インビトロジェン社) または上記の制限酵素サイトの除去を行ったpET24d(+) プラスミドを制限酵素NcoI (宝酒造社) 及びHindIII(宝酒造社) で消化し、0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、ベクター DNA断片を抽出精製した。前述の制限酵素消化した大腸菌からの分泌シグナルをコードするcDNA 及び、精製、検出用のtag をコードするcDNAをこのベクター断片と連結した。各

々のライゲーションは、ライゲーションVer. 2キット（宝酒造社）を使用した。またアガロースゲルからの DNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit（Bio 101社）を用いた。

以上の操作により作製したScFv抗体産生用プラスミドベクターをpSE380ScFv及びpET24ScFv とした。図3、図4にそれぞれの概略図を示した。

### 【0053】

#### 【実施例1】

種々の抗体とヒトCD4との結合親和性を評価するため、ヒト可溶性CD4の生産と精製を行った。健康人より末梢血15mlを採取し、ハンクスバランسد生理食塩水（ギブコ社）で30mlとし、フィコールパック（ファルマシア社）を10mlずつ分注した遠沈管2本に静かに13mlずつ重層し、800回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。この細胞 $1 \times 10^7$ 個からmRNAをQuickPrep mRNA Purification Kit（ファルマシア社）を使用し、添付の説明書に従って単離した。得られたmRNAを鋳型として、1st strand cDNAを合成した。これは、cDNA Synthesis Kit（ファルマシア社）を使用し、添付の説明書に従った。その後、PCR法により、目的の遺伝子の開始コドンから膜貫通領域（TM）の前まで増幅および5'末端側にHindIIIサイトの付加、3'末端側にFLAG-tag配列、ストップコドン、NotIサイトの付加を行った。使用したプライマーは配列表配列番号：11（5' AAGCTTATGAACCGGGAGTCCCTTTTA 3'）および配列番号：12（5' GCGGCCGCTCACTTGTTCATCGTCGTCCTGTAGTCTGGCTGCACCGGG GTGGACCA 3'）である。

### 【0054】

PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase（宝酒造社）を用い、94℃ 1分、57℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480（パーキンエルマー社）を使用した。増幅された遺伝子断片は、TA cloning kit（インビトロジェン社）を使用し、クローニングした。塩基配列の決定は DNA シークエンサー Ver.1.2.0, Model373A（Applied Biosystems社）を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。標識反応は、Universal M13 Reverse primer（インビトロジェン社）ま



たはUniversal M13 Forward primer (インビトロジェン社) をプライマーとして、PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) を用い、方法は添付のプロトコールに従った。染色は、ABI社のラベリングキットを利用した。得られた遺伝子配列の確認後、真核細胞発現ベクターであるpcDNA3プラスミド (インビトロジェン社) およびクローニングしたヒト可溶性CD4cDNA を有するプラスミドを制限酵素HindIII (宝酒造社) と制限酵素NotI (宝酒造社) を用いて消化し、常法によるアガロースゲル電気泳動後、ベクターおよびヒト可溶性CD4cDNA を抽出精製した。この反応はGeneCleanII Kit (Bio 101社) を用い、添付のプロトコールに従って操作した。これら2つのDNAをライゲーションキットVer. 2 (宝酒造社) を用いて連結し、連結反応産物を大腸菌 DH5株へ導入した。出現したコロニーから数個を選んで培養し、常法に従ってプラスミド DNAを抽出精製した。pcDNA3に存在する適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。

#### 【0055】

次に得られたヒト可溶性CD4発現プラスミドを、DEAEデキストラン法 (Bebington, C.R. (1991) ; METHODS : A Companion to Methods in Enzymology, 2 (2), 136-45.) にてそれぞれCOS7細胞へ導入した。COS7細胞を10%ウシ胎児血清 (FBS) 加Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にて、遺伝子組み込みの4日前に直径100mmのディッシュあたり約  $6.1 \times 10^5$  Cells/10mlとなるよう蒔き直し、培養した。4日後、まず上清を除き、PBS(-) にて細胞を静かに洗浄して、4mlの10% FBS加DMEMを加え、次いでDEAEデキストラン/ヒト可溶性CD4発現プラスミド混合液を細胞へ均一にふりかけて、37℃で4時間インキュベートした。この混合液は20mg/mlのDEAEデキストラン (ファルマシア社) 水溶液と、ヒト可溶性CD4発現プラスミドをTBS(-) (20mM Tris · HCl (pH7.4), 0.15M NaCl) により  $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  とした溶液を2:1 (v/v) で混合したものであり、ディッシュあたり  $180 \mu\text{l}$  を添加する。インキュベーション後、上清を捨て、10%ジメチルスルフォキシド (DMSO) 添加PBS(-) 5ml を加えて1分静置した。次いで上清を捨て、PBS(-) で洗浄後、 $100 \mu\text{M}$  クロロキン (Sigma社) 入りの2% FBS添

加DMEM 7mlを加え、37℃で3時間インキュベートした。その後、上清を捨て、PBS(-)で洗浄して、10% FBS加DMEM 10mlを加え、培養した。翌日、PBS(-)及びDMEMにて、FBS加DMEMをよく除去した後、無血清のDMEM 10mlを加え、生産を開始した。

## 【0056】

生産開始から3日後培養上清を回収し、以後約2週間生産を続けた。得られた培養上清を集め、抗FLAG-M2 ゲル(イーストマンケミカル社)カラムクロマトグラフィーにより精製し、これをヒト可溶性CD4の精製標品とした。

## 【0057】

## 【実施例2】

抗ヒトCD4抗体産生ハイブリドーマ4H5(受託番号FERM P-16807)は、10%FBS(ICN社)を添加したDMEM培地(GIBCO社)で培養した。あらかじめハイブリドーマは、限界希釈法で、クローンを分離したのち、培養上清をヒト可溶性CD4(リプリジェン社)を固相化したELISA法にてヒト可溶性CD4への結合性の高いクローンを選択した。この細胞 $1 \times 10^7$ 個からmRNAをQuickPrep mRNA Purification Kit(ファルマシア社)を使用し、添付の説明書に従って単離した。得られたmRNAを鋳型として、1st strand cDNAを合成した。これは、cDNA Synthesis Kit(ファルマシア社)を使用し、添付の説明書に従い行った。その後、PCR法により、上記で取得したcDNAをテンプレートとして、目的の遺伝子の増幅を行った。

## 【0058】

H鎖の取得に関しプライマーは、Mouse Ig-Prime Kit(ノバジェン社)を使用し、配列表配列番号:13(5' GGGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT 3')及び配列番号:14(5' CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACNGRTGG 3')の配列を持つプライマーから遺伝子が増幅された。PCR条件は、GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase(宝酒造社)を用い、94℃ 1分、50℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480(パーキンエルマー社)を使用した。増幅された遺伝子断片は、TA cloning kit(インビトロジェン社)を使用し、クローニングした。

## 【0059】

L鎖の取得に関し、予めL鎖ペプチドのN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (Applied Biosystems社 492 Protein Sequencer) により、N末端から15残基を添付のプロトコールに従って決定した。センスプライマーは、このN末端アミノ酸配列を基にコードしうる塩基配列を複数合成した。アンチセンスプライマーは、マウス抗体遺伝子cDNAが合成しうる配列候補をSequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, 1991 (USA NIH 発行) に掲載されたマウス抗体可変領域の遺伝子配列を参考にして複数合成した。それらセンスプライマーとアンチセンスプライマーを組み合わせた PCR法を行った。配列表配列番号: 15 (5' TGTGCCCTCGAGCTNACNCARAGYCCNGC 3') 及び配列番号: 16 (5' ATGGAT ACTAGTGGTGCAGCATCAGCCC 3') の配列を持つプライマーからL鎖可変領域遺伝子 (部分長) が増幅された。PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社) を使用した。増幅された遺伝子断片は、TA cloning kit (インビトロジェン社) を使用し、クローニングした。

## 【0060】

これら得られた遺伝子のH鎖及びL鎖の可変領域 (部分長) 塩基配列を決定した。塩基配列の決定はDNA シークエンサー Ver.1. 2. 0, Model373A (Applied Biosystems社) を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。標識反応は、Universal M13 Reverse primer (インビトロジェン社) またはUniversal M13 Forward primer (インビトロジェン社) をプライマーとして、PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社) を用い、方法は添付のプロトコールに従った。染色は、ABI社のラベリングキットを利用した。

## 【0061】

更にL鎖の取得に関し、N末端部の未取得領域を取得するために再度 PCR法により、目的の遺伝子の増幅を行った。プライマーは、Mouse Ig-Prime Kit (ノバジェン社) と取得したL鎖「CDR-3」cDNA に相補的な塩基配列を使用し、配列表配列番号: 17 (5' GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT 3') および配列番号: 18

(5' CGTCGGAGGATCCTCACTACT 3') の配列を持つプライマーから遺伝子が増幅された。PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、94℃ 1分、50℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社) を使用した。増幅された遺伝子断片は、TA cloning kitを使用し、クローニングし、同様にL鎖の可変領域(N末端部)塩基配列を、決定した。先にpCR2.1プラスミド(TA cloning kitに添付)上にクローニングされたL鎖の可変領域(部分長)中の制限酵素 PflMIサイトと HindIIIサイトを利用し、L鎖の可変領域(N末端部)とL鎖の可変領域(部分長)の遺伝子を組換え、L鎖可変領域(完全長)の遺伝子断片を構築した。制限酵素 PflMIは New England Biolabs社、制限酵素 HindIIIは宝酒造社のものを使用した。アガロースゲル電気泳動後の抽出精製には GeneCleanII Kit (Bio 101社) を用い、添付のプロトコールに従って操作した。これら2つの DNAの連結には、ライゲーションキットVer. 2 (宝酒造社) を用いた。

#### 【0062】

以上の操作により決定した 4H5抗体H鎖可変領域(完全長)の遺伝子配列をアミノ酸配列とともに配列表配列番号: 37、L鎖可変領域(完全長)の遺伝子配列をアミノ酸配列とともに配列表配列番号: 38に示した。

#### 【0063】

##### 【実施例3】

実施例2で得られた抗ヒトCD4抗体(4H5抗体)のH鎖(アミノ酸4位から118位)、L鎖(アミノ酸4位から111位)可変領域塩基配列を含む遺伝子断片をpGIプラスミドへ組み込み、抗CD4ヒトマウスキメラ抗体を発現可能なプラスミドを作製した。H鎖可変領域の遺伝子断片を含むクローンのプラスミドDNAをテンプレートとして配列表配列番号: 19 (5' CAGGATCCGCTGCAGCAGTCTGGACCT 3') および配列番号: 20 (5' TGGGCCCGTCGTTTTGGCTGCAGAGAC 3') の配列を持つプライマーを用いて、ApaI及び BamHI制限酵素サイトを新たに導入したH鎖可変領域断片をPCR法により作製した。PCR条件は、GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 2分を1サ

イクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480（パーキンエルマー社）を使用した。増幅された断片をTA cloning kit（インビトロジェン社）を使用し、クローニングした。このH鎖（アミノ酸4位から118位）可変領域塩基配列を含むDNA断片を制限酵素ApaI（宝酒造社）及びBamHI（宝酒造社）で消化後、2%アガロース電気泳動ゲルにて展開し、切り出し抽出した。アガロース電気泳動ゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit（Bio 101社）を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。

#### 【0064】

次に、ベクター pG1を制限酵素ApaI及び BamHIで消化後、0.7%アガロース電気泳動ゲルから同様に切り出し抽出したものと連結した。連結反応物を大腸菌JM 109株へ導入した。この連結反応には、ライゲーションキットver. 2（宝酒造社）を用いた。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。これらを組み込みに用いた制限酵素ApaI及び BamHIにて消化し、H鎖可変領域塩基配列を含む断片が挿入されたものを選び出した。次にL鎖に関し、実施例5にて取得した配列表配列番号：13（5' TGTGCCCTCGAGCTNACNCARAGYCCNG C 3'）及び配列番号：14（5' ATGGATACTAGTGGTGCAGCATCAGCCC 3'）の配列を持つプライマーから遺伝子が増幅されたクローンのプラスミドDNA（L鎖（アミノ酸4位から111位）可変領域塩基配列を含む遺伝子断片）を制限酵素XhoI（宝酒造社）及びSpeI（宝酒造社）で消化後、1%アガロース電気泳動ゲルにて展開し、L鎖可変領域塩基配列を含むDNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit（Bio 101社）を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。次に、H鎖可変領域塩基配列を含むDNA断片が挿入されたベクターpG1を制限酵素XhoI及びSpeIで消化後、0.7%アガロースゲルにて同様に切り出し抽出したものと連結し、連結反応物を大腸菌JM 109株へ導入した。この連結反応には、ライゲーションキットver. 2（宝酒造社）を用いた。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。これらを組み込みに用いた制限酵素XhoI及びApaIにて消化し、H鎖及びL鎖可変領域塩

基配列を含む断片が挿入されたものを選び出した。以上の方法にて得られた分泌型抗体発現プラスミドをpG14H5とした。

# 【0065】

## 【実施例4】

実施例3にて得られた分泌型抗体発現プラスミドpG14H5を、DEAEデキストラン法 (Beb-bington, C.R. (1991) ; METHODS : A Compa-nion to Methods in Enzymology, 2 (2), 136-45.)にてそれぞれCOS7細胞へ導入した。COS7細胞を10%ウシ胎児血清 (FBS)加Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にて、遺伝子組み込みの4日前に直径 100mmのディッシュあたり約  $6.1 \times 10^5$  Cells/10mlとなるよう蒔き直し、培養した。4日後、まず上清を除き、PBS(-) にて細胞を静かに洗浄して、4mlの10% FBS加DMEMを加え、次いでDEAEデキストラン/分泌型抗体発現プラスミド混合液を細胞へ均一にふりかけて、37℃で4時間インキュベートした。この混合液は 20mg/mlのDEAEデキストラン (ファルマシア社) 水溶液と、分泌型抗体プラスミドを、TBS(-)(20mM Tris · HCl (pH7.4), 0.15M NaCl)により  $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  とした溶液を2:1 (v/v) で混合したものであり、ディッシュあたり  $180 \mu\text{l}$  を添加する。インキュベーション後、上清を捨て、10%ジメチルスルフォキシド (DMSO) 添加PBS(-) 5ml を加えて1分静置した。

# 【0066】

次いで上清を捨て、PBS(-) で洗浄後、 $100 \mu\text{M}$  クロロキン (Sigma社) 入りの2% FBS添加DMEM 7mlを加え、37℃で3時間インキュベートした。その後、上清を捨て、PBS(-) で洗浄して、10% FBS加 DMEM 10mlを加え、培養した。翌日、PBS(-) 及びDMEMにて FBS加DMEMをよく除去した後、無血清のDMEM 10ml を加え、生産を開始した。

生産開始から3日後培養上清を回収し、以後約2週間生産を続けた。得られた培養上清を集め、プロテインGセファロースカラムクロマトグラフィーにより精製し、これをヒトマウスキメラ抗CD4抗体の精製標品とした (以下キメラ4H5抗体とする)。

# 【0067】

## 【実施例5】

実施例 1 において調製したヒト可溶性 CD 4 を Superdex 200 ゲル濾過カラム (ファルマシア社) と SMARTsystem (ファルマシア社) を用いて、10mM 酢酸緩衝液 pH = 5.0 に buffer 置換した。このヒト可溶性 CD 4 液 (250  $\mu$ g/ml、20  $\mu$ l) をセンサーチップ CM5 (ファルマシア社) のそれぞれ異なるレーンに 5  $\mu$ l/min で送液することによりアミンカップリング法にて固定化し、ヒト可溶性 CD 4 固定化センサーチップを得た。

4H5 抗体またはキメラ 4H5 抗体 (実施例 4 で調製) を Superdex 200 ゲル濾過カラム (ファルマシア社) と SMARTsystem (ファルマシア社) を用いて、HBSbuffer (ファルマシア社) に buffer 置換した。BIA-core2000 (ファルマシア社) を用いて、先に作製したヒト可溶性 CD 4 固定化センサーチップ上に、この 4H5 抗体液またはキメラ 4H5 抗体液 (50  $\mu$ g/ml、20  $\mu$ l) をアナライトとして、5  $\mu$ l/min で各レーンに送液し結合時のセンサグラムを得た。その後 HBSbuffer のみを 5  $\mu$ l/min でセンサーチップの各レーンに送液し解離時のセンサグラムを得た。このセンサグラムの解析によりヒト可溶性 CD 4 と抗ヒト CD 4 抗体との解離定数 (KD: この値が低いほど結合親和性は高い) を得た。その結果、4H5 抗体は  $KD = 8.08 \times 10^{-10}$  M ( $K_{on} = 6.60 \times 10^3$  M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>、 $K_{off} = 5.33 \times 10^{-6}$  s<sup>-1</sup>) であり、キメラ 4H5 抗体では  $KD = 1.24 \times 10^{-9}$  M ( $K_{on} = 2.36 \times 10^4$  M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>、 $K_{off} = 2.92 \times 10^{-5}$  s<sup>-1</sup>) であり、ヒト CD 4 抗原に強く結合しうることが明らかとなった。

【0068】

#### 【実施例 6】

キメラ 4H5 抗体の工業生産利用しうる、安定な高生産株を取得した。工業生産の場合の宿主としては CHO 細胞、ミエローマ Sp 2/0 細胞がよく知られている (Xiang, J. et al. (1990) Mol. Immun., 27, 809; Bebbington, C.R. et al. (1992) Bio/technology, 10, 169; Larrick, J.W. and Wallace, E.F. et al. (1992) Immunol. Rev. 130, 69-85.; Deyev, S.M. and Lieber, A. et al. (1994) Appl. Biochem. Biotechnol. 47 (2-3), 143-54.)。例えば CHO 細胞では、MTX 等の薬剤により生産性の高いクローンを選択する方法も報告されており (Bebbington, C.R. (1991) METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2 (2), 136-45) この方法を参考にし、安定なキメラ 4H5 抗体の高生産株を取得した。

## 【0069】

すなわち、CHOdhfr-株 (ATCC CRL-9096)を電気穿孔法用緩衝液(272mM sucrose、7mM リン酸緩衝液、1mM  $MgCl_2$ 、 $pH=7.4$ )に  $1.0 \times 10^7$  cells/mlの濃度に調製し、電気穿孔法用キュベット(bio-rad社)に  $500 \mu l$  を分注し、氷冷した。ここに実施例3において作製したpG14H5プラスミド $10 \mu g$  とpSV2dhfrプラスミド(ATCC No.37146)  $1 \mu g$  を混合し、5分間氷冷した。 $3 \mu F$ 、0.55kVの電気パルスを与え、1分間氷冷した。もう一度  $3 \mu F$ 、0.55kVの電気パルスを与え、5分間氷冷した。この電気パルスの負荷は bio-rad社のジーンパルサーを用いて行った。細胞を F12培地(GIBCO社)に10% FBSを添加した培地10mlに移し、100mm組織培養用dish (FALCON社)において $37^\circ C$ 、5% $CO_2$  下で一晩培養した。この細胞をトリプシン-EDTA 液(GIBCO社)を用いてdishから剥離し、DMEM培地(GIBCO社)に10%透析FBS (GIBCO社)を添加した培地 120mlに移し、150mm組織培養用dish4枚に播種した。2から3日毎に同培地で培地交換を行った。約2週間程度で肉眼で観察できる程度に細胞のコロニーが形成される。

## 【0070】

コロニーを数十個単離し、それぞれMTX (Amethopterin;SIGMA 社) 20nMを添加したDMEM培地+10%透析FBS (GIBCO社)で培養した。2から3日毎に同培地で培地交換を行い一ヶ月培養した。MTX薬剤耐性を獲得したクローン(同培地中で増殖し得るクローン)をそれぞれMTX100nMを添加したDMEM培地+10%透析 FBS培地で培養した。2から3日毎に同培地で培地交換を行い一ヶ月培養した。最終的に100nM MTX薬剤耐性を獲得したクローン(同培地中で増殖し得るクローン)の培養上清中のキメラ 4H5抗体濃度を human Immunoglobulin G (IgG) subclass EIA kit (The Binding site社)のIgG1用を用いて測定し、安定なキメラ 4H5抗体の高生産株を選択した。これらの手法により、キメラ 4H5抗体を  $5 \mu g/10^6$  cells/day の割合で生産する安定発現株を作製した。

## 【0071】

## 【実施例7】

抗体遺伝子をScFv抗体産生用ベクターに組み込むため、実施例2で得た配列表配列番号:37及び配列番号:38に記載の遺伝子を、制限酵素配列及びリンカー配



列を含むプライマーを使用し、PCR法で増幅させた。L鎖用プライマーは、配列表配列番号：27 (5' AGCCGGCCATGGCCGACATTGTGCTGACCCAATCTCCA 3') 及び配列番号：28 (5' CTCCGGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTTTGATTTCAGCTTGGTGCCTCC 3')、H鎖用プライマーは、配列表配列番号：29 (5' CTCCGGAGGTGGCGGATCGCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCT 3')、及び配列番号：30 (5' TGCGGCCGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTC 3') を使用した。PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、94℃ 45秒、58℃ 45秒、72℃ 1分を1サイクルとして、18サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社) を使用した。増幅された断片をそれぞれTA cloning kit (インビトロジェン社) を使用し、クローニングした。この遺伝子をL鎖は制限酵素NaeI (宝酒造社) 及びMroI (東洋紡社) で消化し、H鎖は制限酵素MroI (東洋紡社) 及びNotI (宝酒造社) で消化した後、2%アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出には、Gene Clean II Kit (Bio 101 社) を用いて行った。

# 【0072】

参考例2において調製したpSE380ScFvまたはpET24ScFv ベクターを制限酵素NaeI (宝酒造社) 及びNotI (宝酒造社) で消化した後、1%アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA断片を切り出し抽出した。これを上記で制限酵素消化したL鎖及びH鎖DNA断片と連結した。ライゲーションは、ライゲーションVer. 2キット (宝酒造社) を使用した。またアガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit (Bio 101社) を用いて行った。以上の操作によって得られたプラスミドをそれぞれ大腸菌DH5株へ導入した。形質転換した大腸菌をpSE380ScFvベクター由来のものはアンピシリン含有LBプレート、またはpET24ScFvベクター由来のものはカナマイシン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られた、抗CD4抗体の配列を有する4H5ScFv(N末VL-linker-VH C末型：以下LH型) 抗体を発現するプラスミドをそれぞれpSE380ScFv4H5LH またはpET24ScFv4H5LHとした。また配列表配列番号

: 9 に、1 本鎖抗体 (ScFv4H5LH) のアミノ酸配列をそれをコードする核酸塩基配列の 1 例とともに示した。

【0073】

【実施例 8】

抗体遺伝子を ScFv 抗体産生用ベクターに組み込むため、実施例 2 で得た配列表配列番号: 37 及び配列番号: 38 に記載の遺伝子を、制限酵素配列及びリンカー配列を含むプライマーを使用し、PCR 法で増幅させた。H 鎖用プライマーは、配列表配列番号: 31 (5' AGCCGGCCATGGCCCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCT 3') 及び配列番号: 32 (5' CTCCGGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTC 3')、L 鎖用プライマーは、配列表配列番号: 33 (5' CTCCGGAGGTGGCGGATCGGACATTGTGCTGACC CAATCTCCA 3')、及び配列番号: 34 (5' TCGGCGCGCTTTGATTTCAGCTTGGTGCCTCC 3') を使用した。PCR 条件は GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、94℃ 45 秒、58℃ 45 秒、72℃ 1 分を 1 サイクルとして、18 サイクル行った。PCR 装置は、型名 DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社) を使用した。増幅された断片をそれぞれ TA cloning kit (インビトロジェン社) を使用し、クローニングした。この遺伝子を H 鎖は制限酵素 NaeI (宝酒造社) 及び MroI (東洋紡社) で消化し、L 鎖は制限酵素 MroI (東洋紡社) 及び NotI (宝酒造社) で消化した後、2% アガロースゲルにて電気泳動し各々の DNA 断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからの DNA 断片の抽出には、GeneClean II Kit (Bio 101 社) を用いて行った。

【0074】

参考例 2 において調製した pSE380ScFv または pET24ScFv ベクターを制限酵素 NaeI (宝酒造社) 及び NotI (宝酒造社) で消化した後、1% アガロースゲルにて電気泳動し各々の DNA 断片を切り出し抽出した。これを上記で制限酵素消化した H 鎖及び L 鎖 DNA 断片と連結した。ライゲーションは、ライゲーション Ver. 2 キット (宝酒造社) を使用した。またアガロースゲルからの DNA 断片の抽出には、GeneClean II Kit (Bio 101 社) を用いて行った。以上の操作によって得られたプラスミドをそれぞれ大腸菌 DH5 株へ導入した。形質転換した大腸菌を pSE380ScFv ベクター由来のものはアンピシリン含有 LB プレート、または pET24ScFv ベクター由来

のものはカナマイシン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミド DNAを抽出精製した。適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られた、抗CD4抗体の配列を有する4H5ScFv (N末 VH-linker-VL C末型：以下HL型) 抗体を発現するプラスミドをそれぞれpSE380ScFv4H5HL またはpET24ScFv4H5HLとした。また配列表配列番号：10に、1本鎖抗体 (ScFv4H5HL) のアミノ酸配列をそれをコードする核酸塩基配列の1例とともに示した。

【0075】

#### 【実施例9】

実施例7のpSE380ScFv4H5LH プラスミドでトランスフォームした大腸菌DH5株を100  $\mu$ g/mlアンピシリンおよび1%グリセロール添加2×YT培地(1.6%バクトトリプトン、1%バクトイーストエキストラクト、0.5%NaCl)にて培養した。翌日この一部を10倍量の上記培地に加え、1時間培養した後上清を除き、1mMのIPTG、100  $\mu$ g/mlアンピシリンおよび1%グリセロール添加2×YT培地の等量に換えて、さらに3時間培養した後、培養上清を除去した菌体を培養容積の1/10量の氷冷したTES液(200mM Tris-HCl (pH=8.0)、0.5mM EDTA、0.5Mスクロース)に懸濁した。10分氷温で放置した後、14000回転/分、4℃、20分遠心分離した。上清を除き、培養容積の1/10量の氷冷したTE液(10mM Tris-HCl (pH=8.0)、0.5mM EDTA)に懸濁した。30分氷温で放置した後、14000回転/分、4℃、20分遠心分離することにより、ペリプラズム中の抗体を回収した。得られた抗体粗画分を抗FLAG-M2ゲル(イーストマンケミカル社)カラムクロマトグラフィーにより精製し、さらにTALON metal affinityゲル(クロンテック社)により精製した。カラムクロマトグラフィーはそれぞれゲルに添付のプロトコールに従って行った。これを抗ヒトCD4 1本鎖抗体 (ScFv4H5LH) の精製標品とした。

【0076】

実施例1において調製したヒト可溶性CD4のPBS(-)溶液(5.2  $\mu$ g/ml)をポリスチレン96穴プレートに50  $\mu$ l ずつ分注し、4℃一晚静置することによって抗原を固定化した。上清を除去したのち0.05%Tween20加PBS(-) (以下PBS-T) 250

$\mu\text{l}$  で洗浄した。ブロックエース（大日本製薬） $100\mu\text{l}$  を個々のウェルに分注し、室温で1時間静置することによってブロッキングを行った。個々のウェルの上清を除去したのち、PBS-T  $250\mu\text{l}$  で2回洗浄した。上清を除去後、上記で調製した抗ヒトCD4 1本鎖抗体（ScFv4H5LH）のPBS（-）溶液、 $10\mu\text{g/ml}$ 、 $50\mu\text{l}$  を分注し、室温で2時間静置反応した。上清を除去したのちPBS-T  $250\mu\text{l}$  で3回洗浄した。上清を除去した後、1000倍にPBS-Tで希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗 myc抗体（インビトロジェン社） $50\mu\text{l}$  を個々のウェルに分注し、室温で2時間静置した。上清を除去したのちPBS-T  $250\mu\text{l}$  で3回洗浄した。上清を除去後、オルトフェニレンジアミン（SIGMA社）のPBS（-）溶液に $0.01\%\text{H}_2\text{O}_2$ を添加した発色液 $50\mu\text{l}$  を加え、室温で7分間反応後、 $2\text{N}$ 硫酸液 $50\mu\text{l}$  を加え酵素反応を停止した。このプレートの  $490\text{nm}$ における吸光度を測定した。その際の吸光度は  $0.574$ であった。また、ヒト可溶性CD4の固定化操作のみをせずと同様の実験を行ったところ、吸光度は  $0.109$ であった。これらの結果より抗ヒトCD4 1本鎖抗体（ScFv4H5LH）はヒトCD4を認識し、親和性を持つことが示された。

【0077】

【実施例10】

2-ヨードアセトアミド（東京化成社） $50\text{g}$ を蒸留水  $100\text{ml}$ に懸濁し、 $37\%$ ホルムアルデヒド（和光純薬工業社） $20\text{ml}$ を加え $50^\circ\text{C}$ 攪拌下で溶解した。炭酸カリウム  $25.2\text{g}$ を徐々に加え、スターラーで10分間攪拌後、室温にて2時間放置した。さらに $4^\circ\text{C}$ で一晩静置したのち、上清をデカンテーションにより捨て、蒸留水を $40\text{ml}$ 加えたのち $50^\circ\text{C}$ で沈殿を溶解し、室温にて2時間放置し、さらに $4^\circ\text{C}$ で一晩再び静置した。この操作をもう一度繰り返してから、生じた沈殿をG-3のガラスフィルター（フィルター径 $30\text{mm}$ ：日本理化学器械（株）社）を通過させることにより回収し、1時間アスピレーターにて吸引乾燥してから、24時間凍結乾燥し、水不溶性担体に導入可能な抗体固定化用活性基であるN-ヒドロキシメチルヨードアセトアミドを調製した。

【0078】

ガラス製のフラスコに硫酸  $5.7\text{ml}$ 、ニトロベンゼン  $7.2\text{ml}$ 及びパラホルムアル

デヒド 0.0363gを加え、攪拌下溶解後、N-ヒドロキシメチルヨードアセトアミド 0.58gを加え攪拌した。これにポリプロピレンからなる不織布（平均繊維直径  $3.3\mu\text{m}$ ）0.3g を入れ室温にて一晩反応した。反応後不織布を取り出し、純水にて洗浄し、これを真空乾燥して、抗体固定化用活性基を導入した不織布を得た。この不織布を直径 0.7cmの円に切断し、それぞれ4枚ずつをPBS(-)に溶解した抗ヒトCD4抗体(4H5抗体)液 ( $17.7\mu\text{g}/400\mu\text{l}$ )または実施例9にて調製した抗ヒトCD4 1本鎖抗体 (ScFv4H5LH)液 ( $17.7\mu\text{g}/400\mu\text{l}$ )に室温にて 2.5時間浸し、抗体を固定した。2.5時間後、PBS(-)で洗浄した。入口と出口を有する容量 1mlの容器に4枚充填しカラムを作成した。また比較対照として牛血清アルブミン(BSA; ピアス社アルブミンスタンダード)を抗体の代わりに同様に固定化したカラムも作成した。

## 【0079】

ヒト健常人血液より実施例1と同様に、フィコールバック（ファルマシア社）を使った密度勾配遠心法により単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をPBS(-)で洗浄し、 $1.2 \times 10^6$  個/ml に調整した。この単核球浮遊液 4mlをシリンジポンプを用いて流速1ml/分で送液し、上記で作製したカラムの入口より流した。カラム出口より処理後の液を回収した。この時のCD4陽性細胞の比率を、公知のフローサイトメトリー法（FACS）で測定した。FACS解析の際の細胞の染色はFITC標識抗CD4抗体（ファーマンジェン社）を用い、FACSCalibur（ベクトン・ディッキンソン社）を用いて測定した。

## 【0080】

表1にカラム通過前後でのCD4陽性細胞と他の細胞（CD4陰性細胞）の比率を示した。また、この実施例の際の4H5抗体固定化カラム通過後のCD4陽性細胞の除去率は100%、ScFv4H5LH固定化カラム通過後のCD4陽性細胞の除去率は99.9%であった。これらの結果より抗ヒトCD4 1本鎖抗体 (ScFv4H5LH) は4H5抗体に比べ、CD4陽性細胞に対しての結合親和性および特異性が4H5抗体と実質的に同じ機能であることが明らかとなった。

## 【0081】

【表1】

	CD4 陽性細胞の比率	他の細胞の比率
カラム通過前	39.3%	60.7%
4H5抗体固定化 カラム通過後	0.3%	99.7%
ScFv4H5LH 固定化 カラム通過後	2.6%	97.4%
牛血清アルブミン固定化 カラム通過後	45.0%	55.0%

【0082】

## 【実施例11】

4H5 ハイブリドーマの取得は、以下のように行った。

血液をフィコールハイパックに重層し、遠心後、単核白血球層を回収し、さらに抗CD8抗体でCD8陽性細胞を免疫沈降除去することでCD4リンパ球を濃縮した画分を得た。さらにこの細胞画分をPHAレクチン（イーワイラボラトリー社）で刺激することで、免疫用細胞を調製した。その細胞をDMEM培地（ギブコ社）で洗浄後、その細胞をアジュバントであるタイターマックス（CytRx社）と混合し、マウス当たり約 $2 \times 10^7$ 細胞をBalb/cマウス（日本チャールズリバー社）腹腔内に投与し免疫した。初回免疫から2週間おきに追加免疫を行った。その後初回免疫から、3ヶ月後に、同様に調製した細胞を静注にて追加免疫した。

BALB/cマウス由来の骨髓腫細胞株であるNS1細胞株（ATCC TIB-18）は、20% F

CS添加DMEM培地（ギブコ社）で継代を行った。

【0083】

上記の免疫動物のマウスから取得した脾臓をほぐし、DMEM培地で洗浄しながらメッシュで濾過後、遠心分離を行い、脾臓細胞を分離した。この脾臓細胞と上記の増殖させたNS1細胞株を混合した後、遠心分離を行った。混合した細胞に対し、ポリエチレングリコール（ベーリンガー・マンハイム社）の最終濃度が30%となるように懸濁した。

細胞を遠心分離で分離し、マウス脾臓細胞をフィーダーとして、20%牛胎児血清を含むDMEM組織培養培地（ギブコ社）で徐々に分散させた。そして、平底の96穴マイクロタイタープレート（ヌンク社製）のウェルに、1ウェル当たり106個/100  $\mu$ lの細胞数の細胞を植え、5%の二酸化炭素中37℃で培養した。

細胞融合後1日目に、各ウェルに100  $\mu$ lのHAT培地（上記の増殖培地に13.6  $\mu$ g/mlヒポキサンチン、3.88  $\mu$ g/mlチミジン及び0.18  $\mu$ M アミノプテリンとなるようにそれぞれを補充した）を添加した。その後3日間は、毎日、約半分のHAT培地を新しいHAT培地と交換し、更にその後は、2～3日ごとに同様の交換を行った。ハイブリドーマ（融合細胞）のクローンはHT培地（アミノプテリンを含まないHAT培地）で培養、保持した。

【0084】

上記のハイブリドーマ複数個を、限界希釈法にてサブクローニングした。これらのハイブリドーマの細胞数を、トリパン青染料排除法及び血球計により計数を行った。そして、これらのハイブリドーマを、100  $\mu$ lのHT培地当たり、0.5個の生育細胞数の割合で懸濁し、96穴の平底マイクロプレートの1ウェル当たり100  $\mu$ lずつ分注した。これを2～3日ごとに培地を交換して、ハイブリドーマを増殖させた。

【0085】

得られたハイブリドーマの培養上清を、ヒト白血球と反応させ、ヒト白血球のCD4陽性細胞を認識する抗体を検出した検出は、FACScan（ベクトン・ディッキンソン社）で行った。本操作により、得られた抗体群より、特異性、結合性の優れた4H5細胞を取得することに成功した。

【0086】

【発明の効果】

本発明により、CD4陽性細胞の分離を特異的かつ効率よく行うことが可能となった。本発明は、自己免疫疾患などの治療を目的とした自己反応性抗原受容体を持ったTリンパ球の捕集、骨髓移植用細胞からのリンパ球除去などの分野において有効である。

【0087】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

Asp Tyr Val Ile Asn

1 5

【0088】

配列番号：2

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys

1 5 10 15

Gly



【0089】

配列番号：3

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr

1

5

【0090】

配列番号：4

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1

5

10

15

【0091】

配列番号：5

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1

5

【0092】

配列番号：6

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr

1

5

【0093】

配列番号：7

配列の長さ：330

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT 48

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala

1

5

10

15

TCT GGA TAC ACA TTC ACT GAC TAT GTT ATA AAC TGG TTG AAC CAG AGA 96

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg

20

25

30

ACT GGA CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA GAG ATT TAT CCT GGA AGT GGT 144

Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly

35

40

45

AGT GCT TAC TAC AAT GAG ATG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA 192

Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala

50

55

60

GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT 240

Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser

65

70

75

80

GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGC GGA ACT GGG ACG GGG 288

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly

85

90

95

TTT GCT TAC TGG GGC CGA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 330

Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

100

105

110

【0094】

配列番号 : 8

配列の長さ : 309

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : マウス

株名 : 4H5

配列

GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG 48

Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys

1

5

10

15

GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC 96

Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr	
20 25 30	
CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC	144
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser	
35 40 45	
AAT CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG	192
Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
50 55 60	
ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA	240
Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala	
65 70 75 80	
ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AGT GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA	288
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly	
85 90 95	
GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA	309
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	

100

【0095】

配列番号：9

配列の長さ：925

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCG	48
---	----

Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	
1				5						10					15	
GCC	CAG	CCG	GCC	ATG	GCC	GAC	ATT	GTG	CTG	ACC	CAA	TCT	CCA	GCT	TCT	96
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	
			20					25						30		
TTG	GCT	GTG	TCT	CTA	GGG	CAG	AGG	GCC	ACC	ATC	TCC	TGC	AAG	GCC	AGC	144
Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
			35				40							45		
CAA	AGT	GTT	GAT	TAT	GAT	GGT	GAT	AGT	TAT	ATG	AAC	TGG	TAC	CAA	CAG	192
Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	
	50					55						60				
AAA	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GCT	GCA	TCC	AAT	CTA	240
Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	
65				70					75					80		
GAA	TCT	GGG	ATC	CCA	GCC	AGG	TTT	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	288
Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	
				85					90					95		
TTC	ACC	CTC	AAC	ATC	CAT	CCT	GTG	GAG	GAG	GAG	GAT	GCT	GCA	ACC	TAT	336
Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	
			100					105						110		
TAC	TGT	CAG	CAA	AGT	AGT	GAG	GAT	CCT	CCG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	384
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Ser	Glu	Asp	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	
		115				120						125				
AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	TCC	GGA	432
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
	130					135						140				
GGT	GGC	GGA	TCG	CAG	GTT	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGA	CCT	GAG	CTG	GTG	480
Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	
145				150						155				160		

AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA	528
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr	
165 170 175	
TTC ACT GAC TAT GTT ATA AAC TGG TTG AAC CAG AGA ACT GGA CAG GGC	576
Phe Thr Asp Tyr Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg Thr Gly Gln Gly	
180 185 190	
CTT GAG TGG ATT GGA GAG ATT TAT CCT GGA AGT GGT AGT GCT TAC TAC	624
Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr	
195 200 205	
AAT GAG ATG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC	672
Asn Glu Met Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser	
210 215 220	
AAC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG	720
Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala	
225 230 235 240	
GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGC GGA ACT GGG ACG GGG TTT GCT TAC TGG	768
Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp	
245 250 255	
GGC CGA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCG GCC GCA GAC TAC AAG	816
Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ala Ala Asp Tyr Lys	
260 265 270	
GAT GAC GAT GAC AAA GGC TCG AGC GAG CAG AAG CTG ATC AGC GAA GAG	864
Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu	
275 280 285	
GAT CTG GGC TCG AGG TCG ACC CAC CAT CAT CAT CAC CAC GGG TCG ACC	912
Asp Leu Gly Ser Arg Ser Thr His His His His His His Gly Ser Thr	
290 295 300	
AAA TGA TAA GCT T	925
Lys	

305

【0096】

配列番号：10

配列の長さ：925

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCG	48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala	
1 5 10 15	
GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG	96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu	
20 25 30	
CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA	144
Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly	
35 40 45	
TAC ACA TTC ACT GAC TAT GTT ATA AAC TGG TTG AAC CAG AGA ACT GGA	192
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg Thr Gly	
50 55 60	
CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA GAG ATT TAT CCT GGA AGT GGT AGT GCT	240
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala	
65 70 75 80	
TAC TAC AAT GAG ATG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA	288
Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys	

85	90	95	
TCC TCC AAC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC	336		
Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp			
100	105	110	
TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGC GGA ACT GGG ACG GGG TTT GCT	384		
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala			
115	120	125	
TAC TGG GGC CGA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GGT GGA GGC GGT	432		
Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly			
130	135	140	
TCA GGC GGA GGT GGC TCC GGA GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG CTG ACC	480		
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr			
145	150	155	160
CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC	528		
Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile			
165	170	175	
TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG	576		
Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met			
180	185	190	
AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT	624		
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
195	200	205	
GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT	672		
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser			
210	215	220	
GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG	720		
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu			
225	230	235	240
GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AGT GAG GAT CCT CCG ACG	768		



Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr

250

255

TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA GCG GCC GCA GAC TAC AAG 816

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala Asp Tyr Lys

265

270

GAT GAC GAT GAC AAA GGC TCG AGC GAG CAG AAG CTG ATC AGC GAA GAG 864

Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

280

285

GAT CTG GGC TCG AGG TCG ACC CAC CAT CAT CAT CAC CAC GGG TCG ACC 912

Asp Leu Gly Ser Arg Ser Thr His His His His His His Gly Ser Thr

295

300

AAA TGA TAA GCT T

925

**Lys**

305

【 0 0 9 7 】

配列番号： 1 1

配列の長さ : 28

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

## 配列

AAGCTTATGA ACCGGGGAGT CCCTTTTA

28

【 0 0 9 8 】

配列番号：1 2

配列の長さ : 56

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

## 配列

GC GGCCGCTC ACTTGTCATC GTCGTCCTTG TAGTCTGGCT GCACCGGGGT GGACCA

56

【 0 0 9 9 】

配列番号 : 13

配列の長さ : 34

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

GGGAATTCAT GRAATGSASC TGGGTWYTC TCTT

34

【0100】

配列番号 : 14

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

CCCAAGCTTC CAGGGRCCAR KGGATARACN GRTGG

35

【0101】

配列番号 : 15

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

TGTGCCCTCG AGCTNACNCA RAGYCCNGC

29

【0102】

配列番号 : 16

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

ATGGATACTA GTGGTGCAGC ATCAGCCC

28

【0103】

配列番号 : 17

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

GGGAATTCAT GGAGACAGAC AACTCCTGC TAT

33

【0104】

配列番号 : 18

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

CGTCGGAGGA TCCTCACTAC T

21

【0105】

配列番号 : 19

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

CAGGATCCGC TGCAGCAGTC TGGACCT

27

【0106】

配列番号 : 20

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

TGGGCCCGTC GTTTTGGCTG CAGAGAC

27

【0107】

配列番号 : 21

配列の長さ : 56

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

TCATGAAATA CCTGCTGCCG ACCGCTGCTG CTGGTCTGCT GCTCCTCGCG GCCCAG 56

【0108】

配列番号：22

配列の長さ：56

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

TGCGGCCGCA GCCATGGTGT TTGCGGCCAT CGCCGGCTGG GCCGCGAGGA GCAGCA 56

【0109】

配列番号：23

配列の長さ：56

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

TGCGGCCGCA GACTACAAGG ATGACGATGA CAAAGGCTCG AGCGAGCAGA AGCTGA 56

【0110】

配列番号：24

配列の長さ：57

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

GGTGGGTCGA CCTCGAGCCC AGATCCTCTT CGCTGATCAG CTTCTGCTCG CTCGAGC 57

【0111】

配列番号：25

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

TGCGGCCGCA GACTACAAGG ATG

23

【0112】

配列番号：26

配列の長さ：56

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

TAAGCTTATC ATTTGGTCGA CCCGTGGTGA TGATGATGGT GGGTCGACCT CGAGCC

56

【0113】

配列番号：27

配列の長さ：38

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

AGCCGGCCAT GGCCGACATT GTGCTGACCC AATCTCCA

38

【0114】

配列番号：28

配列の長さ：58

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CTCCGGAGCC ACCTCCGCCT GAACCGCCTC CACCTTTGAT TTCCAGCTTG GTGCCTCC

58

【0115】

配列番号：29

配列の長さ：40

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CTCCGGAGGT GCGGATCGC AGGTTTCAGCT GCAGCAGTCT

40

【0116】

配列番号：30

配列の長さ：31

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

TGCGGCCGCT GCAGAGACAG TGACCAGAGT C

31

【0117】

配列番号：31

配列の長さ：35

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

AGCCGGCCAT GGCCCAGGTT CAGCTGCAGC AGTCT

35

【0118】

配列番号：32

配列の長さ：56

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CTCCGGAGCC ACCTCCGCCT GAACCGCCTC CACCTGCAGA GACAGTGACC AGAGTC

56

【0119】

配列番号：33

配列の長さ：43

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CTCCGGAGGT GCGGATCGG ACATTGTGCT GACCCAATCT CCA

43

【0120】

配列番号：34

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

TGCGGCCGCT TTGATTCCA GCTTGGTGCC TCC

33

【0121】

配列番号：35

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

【0122】

配列番号：36

配列の長さ：111

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

20

25

30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35

40

45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65

70

75

80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser

85

90

95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

【0123】

配列番号：37

配列の長さ：354

配列の型：核酸



鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

## 起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1                      5                      10                      15

TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT GAC TAT 96

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20                      25                      30

GTT ATA AAC TGG TTG AAC CAG AGA ACT GGA CAG GGC CTT GAG TGG ATT 144

Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

**35                      40                      45**

GGA GAG ATT TAT CCT GGA AGT GGT AGT GCT TAC TAC AAT GAG ATG TTC 192

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe

50                      55                      60

AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC 240

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65                      70                      75                      80

ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT 288

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85                      90                      95

GCA AGA CGC GGA ACT GGG ACG GGG TTT GCT TAC TGG GGC CGA GGG ACT 336

Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly Thr

100                      105                      110

CTG GTC ACT GTC TCT GCA 354

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

【0124】

配列番号：38

配列の長さ：333

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：マウス

株名：4H5

配列

GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG	48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT	96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp	
20 25 30	
GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC	144
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
35 40 45	
AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC	192
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala	
50 55 60	
AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT	240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His	
65 70 75 80	
CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AGT	288

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser

85

90

95

GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA

333

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

【図面の簡単な説明】

【図 1】

IgG の構造を模式的に示す。

【図 2】

pG1 プラスミドの概略図である。

【図 3】

pSE380ScFvプラスミドの概略図である。

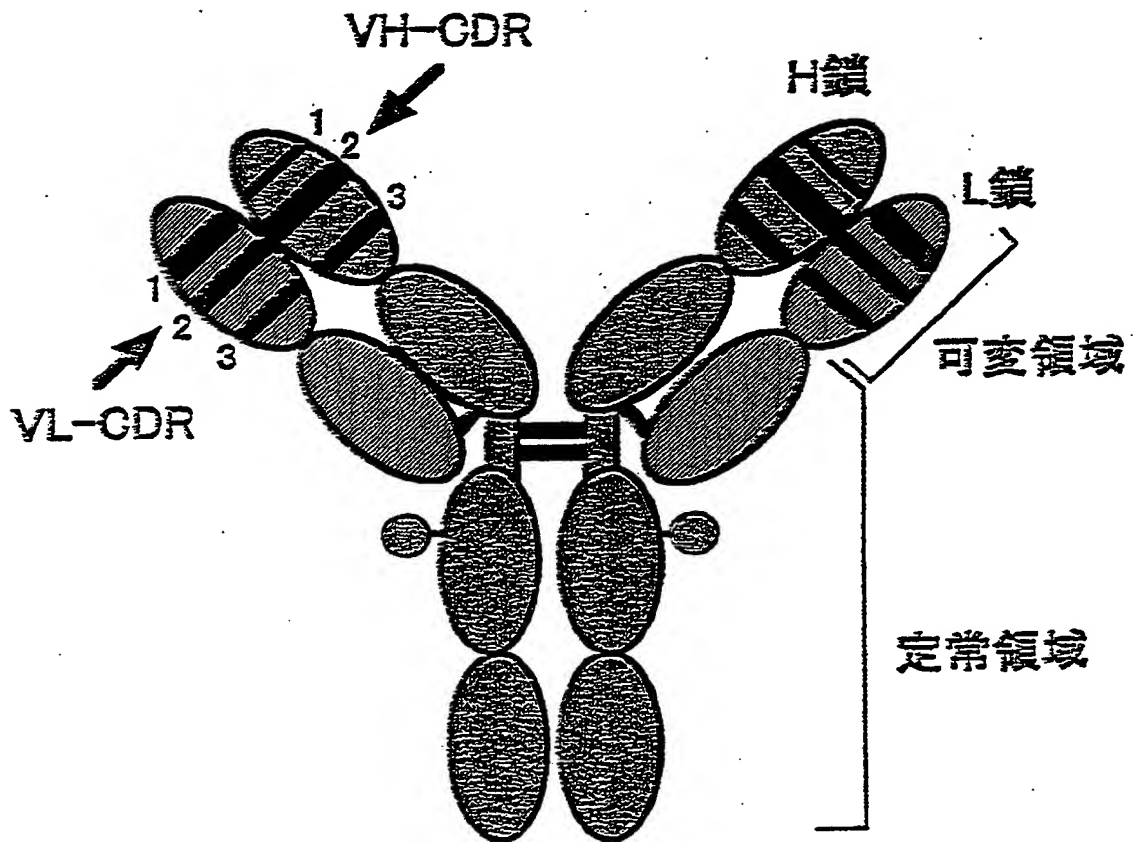
【图4】

pET24ScFv プラスミドの概略図である。

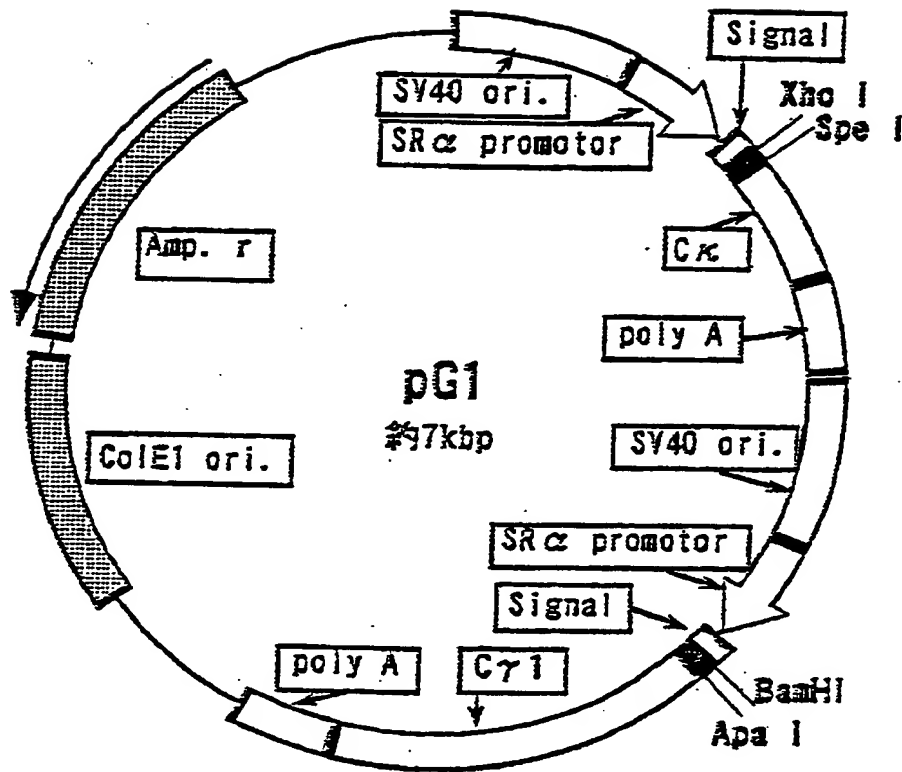
【書類名】

図面

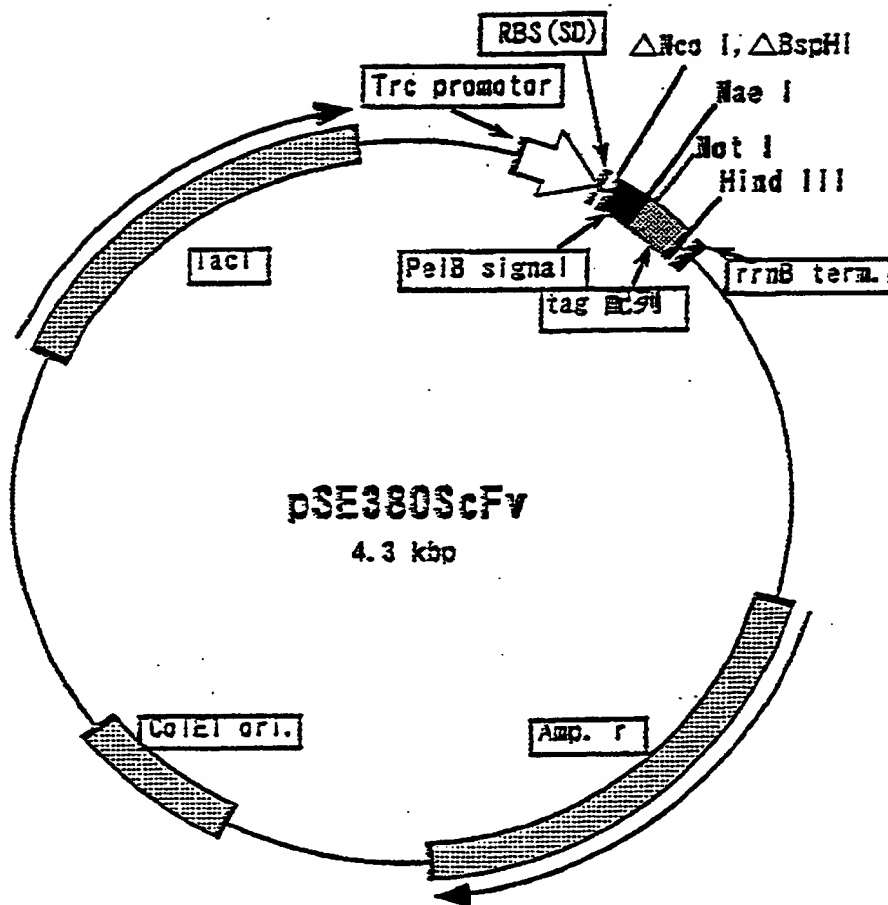
【図 1】



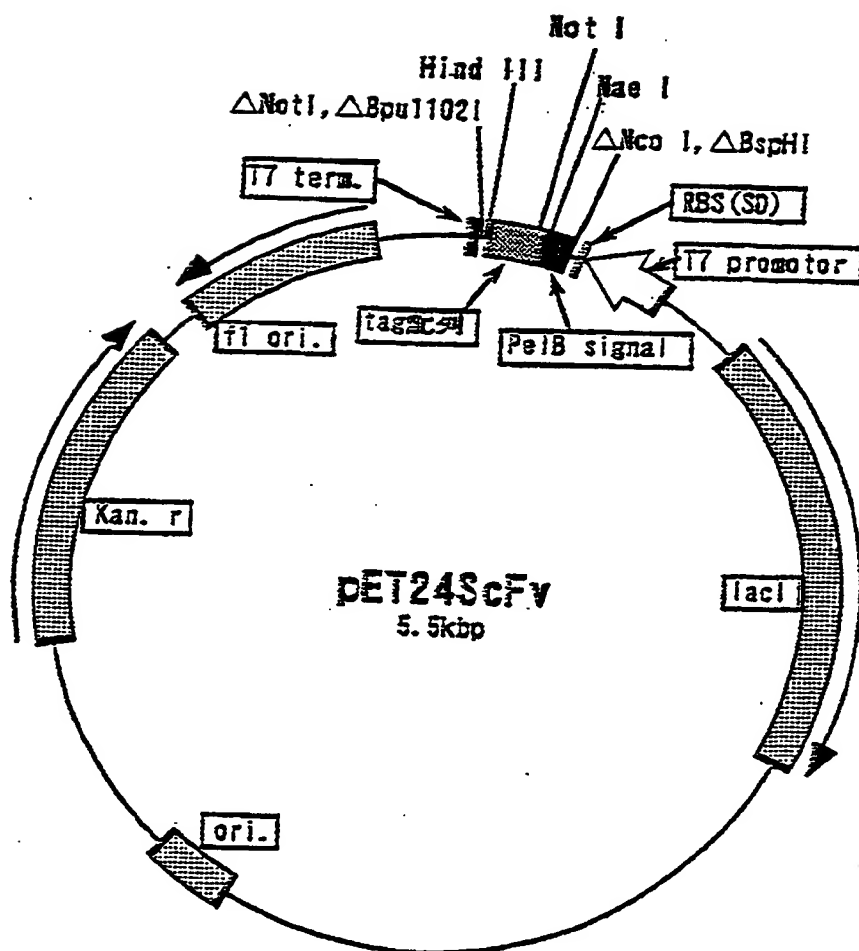
【図2】



【図 3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 組換え抗体を利用したCD4陽性細胞を分離検出する装置を提供する

。

【解決手段】 抗CD4抗体の遺伝子から産生した組換え抗体を利用することにより、安全かつ安価なCD4陽性細胞分離装置あるいはこの装置を使用する分離検出方法を提供する。

【効果】 従来の方法に比べ抗CD4抗体を大量に生産することが可能であることから、自己免疫疾患治療を目的とした自己反応性抗原受容体をもったTリンパ球の捕集、骨髄移植用細胞からのリンパ球の除去などの分野において有効である

。

【選択図】 なし





書式 7

受 託 証

通知番号 : 10 生寄文 第 652 号

通知年月日: 平成 10 年 5 月 14 日

旭化成工業株式会社  
代表取締役 山本 一元 殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

大 署 信



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Mouse-Mouse hybridoma 4H5	(受託番号) FERM P- 16807
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>1 瓶の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p>■ 科学的性質</p> <p>■ 分類学上の位置</p>	
3. 受領及び受託	
<p>当所は、平成 10 年 5 月 14 日に受領した 1 瓶の微生物を受託する。</p>	

【書類名】 職権訂正データ  
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
     【識別番号】 000000033  
     【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号  
     【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社  
 【代理人】 申請人  
     【識別番号】 100090941  
     【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階  
                 藤野特許事務所  
     【氏名又は名称】 藤野 清也  
 【提出された物件の記事】  
     【提出物件名】 受託証 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000033]

1. 変更年月日

1990年 8月16日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

氏 名

旭化成工業株式会社

